

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100250832 B1
 (44)Date of publication of specification: 07.01.2000

(21)Application number: 1019970030697

(71)Applicant: KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

(22)Date of filing: 02.07.1997

(30)Priority: ..

(72)Inventor: HONG, HYO JEONG
RYU, CHUN JE

(51)Int. Cl. C12N 15/13

(54) CDNA CODING RATS MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZING ANTIGEN PRE-S1 EPTOPE OF HEPATITIS B VIRUS

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is cDNA gene coding rats monoclonal antibody KR359 which binds with 43-49 amino acids of antigen pre-S1 epitope of hepatitis B virus in order to use the gene to bind with human antibody genes and consequently develop human antibodies with fewer side effects. CONSTITUTION: cDNA gene coding rats monoclonal antibody KR359 is obtained by the following steps of: i) extracting RNA from hybridoma cell line (KCTC 0334 BP) and synthesizing cDNA for light and heavy chains; ii) implementing PCR with cDNA as a template and a

primer of sequence ID. No. 1 of 5-GCAGTCGACT GAGGCACCTC CAGATGTAA C-3 for light chain and a primer of sequence ID. No. 2 of 5-CGGTCGACAG GGATCCAGAG TTCCAGGTCA C-3 for heavy chain; iii) and obtaining 420bp cDNA of sequence ID. No. 8 described as in the description as a light chain and 500bp cDNA of sequence ID. No. 9 described as in the description as a heavy chain. Wherein, cDNA is also used in constructing plasmid vectors pKR127H and pKR127K.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19970702)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (19991011)

Patent registration number (1002508320000)

Date of registration (20000107)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

Date of extinction of right ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
 C12N 15/13

(11) 공개번호 특 1999-008650
 (43) 공개일자 1999년 02월 05일

(21) 출원번호 특 1997-030697
 (22) 출원일자 1997년 07월 02일
 (71) 출원인 한국과학기술연구원 박원준
 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지
 (72) 발명자 홍효경
 대전광역시 유성구 가경동 237 케이아이티아파트 15동 401호
 류춘재
 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 136동 1203호
 (74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 비형 간염 바이러스의 표면 항원 프라-에스 1 에피토프를 인식하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호하는 유전자 및 그의 염기 서열

요약

본 발명은 B형 간염 바이러스 (HBV)의 표면 항원 프라-S1 에피토프에 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 그의 cDNA 유전자 및 그의 염기 서열에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 HBV의 표면항원 프라-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호하는 중쇄와 경쇄 cDNA 유전자, 그들의 염기 서열 및 이를 포함하는 플라스미드 벡터들에 관한 것으로서, 상기 유전자는 HBV 감염을 예방하고 치료하는 인간화 항체 등을 개발하는데 사용될 수 있다.

대표도

도 1

중쇄서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 생쥐 단일클론항체 KR127의 가변 영역을 암호하는 경쇄 유전자의 cDNA 염기 서열 및 이로부터 유추한 아미노산 서열이고,

도 2는 본 발명의 생쥐 단일클론항체 KR127의 가변 영역을 암호하는 중쇄 유전자의 cDNA 염기 서열 및 이로부터 유추한 아미노산 서열이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 B형 간염 바이러스 (hepatitis B virus, 이하 HBV라고 약칭함)의 표면 항원 프라-S1 에피토프에 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, cDNA 유전자 및 그의 염기 서열에 관한 것이다.

보다 상세하게는, 본 발명은 HBV의 표면항원 프라-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역, 이를 암호하는 중쇄와 경쇄 cDNA 유전자, 그들의 염기 서열 및 이를 포함하는 플라스미드 벡터들에 관한 것으로서, 상기 유전자는 HBV 감염을 예방하고 치료하는 인간화 항체 등을 개발하는데 사용될 수 있다.

B형 간염 바이러스 (HBV)는 사람에게 침입하여 만성 및 급성 간염을 일으키고, 악화된 경우 간경화와 간암의 원인이 되는 병원체로서, 전세계적으로 3억명에 이르는 사람이 감염된 것으로 추산된다 (Tilialis Buendia, Sci. Am., 264: 48, 1991).

HBV에 감염된 경우, 특히 HBV 양성인 모친으로부터 태어나는 신생아, HBV에 노출된 의료기관 종사자 또는 HBV 관련 간질환으로 인해 간이식 수술을 받은 환자에서 HBV 감염을 방지하기 위해 HB 면역 글로불린 (HB immunoglobulin, HBIG)이 사용되고 있다 (Beasley, et al., Lancet, 2: 1099, 1983; Todo, et al., Hepatol., 13: 619, 1991). 그러나 현재 사용되는 HBIG는 혈장으로부터 추출되기 때문에 특이도 (specificity)가 낮고 오염원에 노출되어 있으며, 이를 대량 생산하는데 사람 혈액의 계속적인 공급이 필

요하다는 단점이 있다. 이러한 단점은 HBV 의 표면항원에 대한 단일클론항체를 개발하여 사용하면 극복할 수 있다.

HBV 의 피막은 3개의 단백질로 구성되는데, 구체적으로 S 항원을 포함하는 주(major) 단백질, S 항원과 프리-S2 항원을 포함하는 중(middle) 단백질 및 S 항원, 프리-S2 항원과 프리-S1 항원을 포함하는 대(large) 단백질로 구성된다(Neurath, A.R. and Kont, S.B.H., Adv. Vir. Res. 34: 65-142, 1988). 이 모든 표면항원 단백질들은 HBV를 중화시키고 무력화하는 항체를 유도하며, 특히 프리-S1 부위에 의해 유도되는 항체는 바이러스의 제거 및 급성 HBV 감염에서의 회복과 관련이 있고 S 항원에 대한 무면역반응(Non-responsiveness)을 극복할 수 있다(Iwarson, S. et al., J. Med. Virol. 16: 89-96, 1985; Itoh, Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9174-9178, 1986; Neurath, A. R. et al., Vaccine, 7: 234-236, 1989; Budkowska, A. et al., J. Med. Virol., 20: 111-125, 1986; Milich D. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 8169-8172, 1985; Neurath, A. R. et al., J. Med. Virol. 17: 119-125, 1985; Milich D. R. et al., J. Immunol., 137: 315-322, 1986). 특히 프리-S1 단백질의 21-47번 아미노산 부위는 사람 간세포의 HBV 수용체와 결합하여 바이러스가 간세포에 감염하는데 결정적인 역할을하므로, 이 부위에 특이한 단일클론항체는 바이러스 중화에 매우 중요한 역할을 할 수 있다(Neurath, et al., Cell: 46, 429, 1986; Pontisso, et al., Virol., 173: 533 1989; Neurath, et al., Vaccine, 7: 234, 1989).

본 발명자 등은 HBV 의 표면항원 프리-S1 단백질의 21-47번 아미노산 부위에 대한 단일클론항체를 얻기 위하여 시도한 결과, 이들 에피토프를 특이적으로 인식하는 다양한 단일클론항체를 개발하였다. 특히 43-49번 아미노산 위치의 에피토프를 인식하는 단일클론항체 KR127 는 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV 에도 광범위하게 적용될 수 있으며, HBV 감염을 예방하고 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

그러나 상기 생쥐에서 만들어낸 단일클론항체는 사람에게 주사하였을 경우 면역반응을 유발하는 부작용을 나타낸다. 따라서 생쥐 항체를 인간화시킨 인간화항체를 사용하여 이러한 문제점을 줄이려는 시도가 이루어졌다. 인간화 항체는 생쥐 단일클론항체의 가변 영역 중에서 항원과 직접 결합하는 CDRs (complementarity determining regions) 영역을 사람 항체에 이식시켜 재조합할 수 있다. 이를 위해서 생쥐 항체 가변 영역의 유전자를 얻고 이를 유전자 재조합 방법으로 사람 항체의 유전자와 융합시켜 동물세포에서 발현시켜야 한다(Verhoeven, et al., Science, 239: 1534-1536, 1988).

이제 본 발명자들은 HBV 감염을 효과적으로 예방하고 치료하는 인간화 단일클론항체를 제조하기 위하여, HBV 표면 항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산 위치의 에피토프와 결합하는 단일클론항체 KR127 를 생산하는 하이브리도마 세포주를 이용하여 상기 항체 가변 영역의 종쇄와 경쇄 cDNA 를 얻고 그의 DNA 염기 서열을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 HBV 의 표면항원 프리-S1 의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체 KR127 의 가변 영역, 이를 암호화하는 종쇄와 경쇄 cDNA 유전자 및 그의 서열을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 생쥐 단일클론항체 KR127 의 가변 영역을 암호화하는 종쇄 cDNA 유전자 및 그의 서열 9 의 염기 서열을 제공한다. 또한 본 발명은 생쥐 단일클론항체 KR127 의 가변 영역을 암호화하는 경쇄 cDNA 유전자 및 그의 서열 6 의 염기 서열을 제공한다.

또한 본 발명은 상기 단일클론항체의 종쇄 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 pKR127H (수탁번호: KCTC 0333 8P) 및 경쇄 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 pKR127K (수탁번호: KCTC 0334 8P)를 제공한다.

또한, 본 발명은 서열 11 의 종쇄 및 서열 10 의 경쇄로 이루어진 생쥐 단일 클론항체 KR127 의 가변 영역을 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 HBV 의 표면항원 프리-S1 의 항원성에 중요한 역할을 하는 21-47번 아미노산 부위 중 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프와 결합하는 생쥐 단일클론항체 유전자를 얻기 위하여, 단일클론항체 KR127 을 생산하는 하이브리도마 세포주(수탁번호: KCTC 0289 8P)를 이용한다.

구체적으로 상기 하이브리도마 세포주로부터 RNA 를 추출하여 경쇄 및 종쇄 유전자의 cDNA 를 합성하고, 이를 증폭하여 하여 경쇄의 경우 서열 1 의 시발체를 이용하고 종쇄의 경우 서열 2 의 시발체를 이용하여 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 그 결과 본 발명의 서열 8 의 염기 서열을 포함하는 약 420 bp 크기의 경쇄 cDNA 유전자 및 서열 9 의 염기 서열을 포함하는 약 500 bp 크기의 종쇄 cDNA 유전자를 분리하였다.

상기 cDNA 유전자를 플라스미드 벡터 pBluescript KSt 에 각각 클로닝하여 본 발명의 플라스미드 벡터 pKR127H 및 pKR127K 를 제조하였다.

상기 플라스미드 벡터들을 대장균에 형질전환시켜 얻은 형질전환체를 1997년 5월 29일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 0333 8P, KCTC 0334 8P).

또한, 본 발명은 서열 11 의 아미노산 서열을 가지는 종쇄 가변 영역 및 서열 10 의 아미노산 서열을 가지는 경쇄 가변 영역으로 이루어진 생쥐 단일클론항체의 가변 영역을 제공한다.

본 발명의 생쥐 항체 가변 영역의 유전자는 생쥐 항체를 인간화시키는데 이용될 수 있다. 생쥐 단일클론항체의 가변 영역 중에서 항원과 직접 결합하는 CDRs 영역을 사람 항체에 이식시켜 인간화 항체를 제조하면 부작용이 없는 단일클론항체를 재조합할 수 있고, 특히 단일클론항체 KR127 를 이용한 인간화 항체는 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV 를 예방하고 치료하는데 광범위하게 적용될 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하기로 한다. 단 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 생쥐 하이브리도마 KR127 세포주로부터 전체 RNA의 분리 및 그의

cDNA 합성

HEV 표면 항원 프라-S1의 43-49번 아미노산을 인식하는 생쥐 단일클론항체를 생산하는 1×10^7 개의 하이브리도마 KR127 세포주로부터 단일 단계 방법 (Single step method; Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem., 162: 156-159, 1987)으로 추출한 전체 RNA 10 μ g를 주형으로 사용하고 경색의 경우는 서열 1의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-M)를, 중쇄의 경우는 서열 2의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-M)를 각각 50 pmol 씩 항체 발현영역에 상보적인 시발체로 사용하여 70°C에서 10분 동안 어닐링시켰다. 이에 슈퍼스크립트 II (Superscript II, 기브코사) 효소를 첨가하여 역전사반응을 수행함으로써 1차 cDNA를 합성하였다.

상기 단일클론항체의 유전자는 합성된 1차 cDNA의 5'단의 1분획을 주형으로 하고 벤트 DNA 중합효소 (Vent DNA polymerase, 뉴잉글랜드 바이오랩사)를 사용한 PCR을 수행하여 증폭시켰다. 이 때 사용한 시발체는 경색의 경우, 3'쪽 시발체는 면역유전자 카파사슬 발현 영역에 상보적인 서열 1의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머를, 5'쪽 시발체는 가변 영역의 다양한 아미노 발단을 고려하여 고안한 혼합된 시발체로 서열 3의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (33-M)와 서열 4의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (39-M) 두 종류의 시발체를 사용하였다. 중쇄의 경우는, 3'쪽 시발체로는 면역유전자 C γ 1 영역에 상보적인 서열 2의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (31-M)를, 5'쪽 시발체로는 가변 영역의 다양한 아미노 발단을 고려하여 고안한 혼합된 시발체로 서열 5의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (46-M), 서열 6의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (32-M), 및 서열 7의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 올리고머 (32-M), 세 종류의 시발체를 사용하였다.

PCR 생산물의 효율적인 클로닝을 위하여 경색의 경우는 3'쪽 시발체 말단에 *Sa*I / 제한효소 자리를 부여하였고, 중쇄의 경우에는 5'쪽 시발체와 3'쪽 시발체에 둘다 *Sa*I / 제한효소 자리를 부여하였다. PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 반응조건으로 30회 반복하여 수행하였다. 그 결과 상기 시발체 위치로부터 추정되는 길이인 경색는 약 420bp, 중쇄는 약 500bp 크기에 해당되는 부위에서 증폭된 DNA를 얻을 수 있었다.

실시예 2 생쥐 단일클론항체 KR127 유전자의 클로닝

상기 실시예 1에서 증폭한 경색 유전자를 클로닝하기 위하여 먼저 PCR 산물을 T₄ 폴리뉴클레오타이드 카이네이트 (polynucleotide kinase, 비탈미 만화임사)로 인산화 반응을 시킨 다음 *Sa*I / 으로 처리하고, 1% 아가로스 젤에 전가시켜서 약 420bp에 해당하는 DNA를 진글린 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 이를 클로닝하기 위하여 플라스미드 벡터 pBluescript SK+를 *Sma*I로 처리하고 다시 *Sa*I / 으로 처리한 다음 진글린 II (GeneClean II, Bio101사) 키트를 사용하여 분리하였다. 이 두 DNA를 T₄ DNA 라이게아제 (뉴잉글랜드 바이오랩사)를 사용하여 연결하고 대장균 NM522에 *CaCl*₂ 방법으로 형질전환한 다음, 약 420bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 K1, K4, K5 클론을 선별하였다.

또한, 중쇄 유전자를 클로닝하기 위해서 상기 실시예 1에서 증폭한 중쇄 유전자를 *Sa*I / 으로 처리하고, 1% 아가로스 젤에 전가시켜서 약 500bp에 해당하는 DNA를 진글린 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 클로닝할 벡터로 사용한 플라스미드 벡터 pBluescript KSt는 *Sa*I / 으로 처리하고 숏아지 장 탈인산화효소 (Calf intestinal phosphatase, 뉴잉글랜드 바이오랩사)로 탈인산화 반응을 시킨 다음, 진글린 II (GeneClean II, Bio101사)를 사용하여 분리하였다. 이 두 DNA를 T₄ DNA 라이게아제 (뉴잉글랜드 바이오랩사)를 사용하여 연결하고 대장균 NM522에 *CaCl*₂ 방법으로 형질전환한 다음, 500bp 크기의 DNA 삽입물을 가진 H3, H5, H6, H8 클론을 선별하였다.

상기 면역 유전자들의 DNA 염기 서열을 분석하기 위하여, 상기의 각 클론들을 150 μ g/ml의 알파실린이 함유된 1ml의 2 x YT 배지에서 OD 0.5 까지 키운 뒤 대장균수보다 10배 더 많은 헬파 파지 M13K07 (helper phage M13K07)를 넣어주고 7 μ g/ml의 카나마이신이 함유된 10ml의 2 x YT 배지에서 6시간 더 배양한 다음 상층액에서 단선 DNA를 5% 폴리에틸렌글리콜 (PEG)로 농축하고 페놀/클로로포름으로 여러번 추출하여 분리하였다. 이 단선 DNA들을 주형으로 T₃ 또는 T₇ 시발체를 사용하여 시퀀스네이션 버전 II 키트 (Sequenase version II kit, 애머샴사)를 이용하여 각 클론들의 염기 서열을 분석하였다. 그 결과 경색의 4가지 클론들의 염기 서열이 모두 같았으며, 이 클론에서 분리한 플라스미드 벡터를 pKR127K 라 명명하였다. 중쇄도 3가지 클론들의 염기 서열이 모두 같았으며, 이 클론에서 분리한 플라스미드 벡터를 pKR127H 라 명명하였다. 이상에서 확인된 염기 서열 결과는 도 1 및 도 2에 나타나 있다.

상기 플라스미드 벡터를 1997년 5월 29일에 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다. (수탁번호 : KCTC 0333 BP, KCTC 0334 BP).

실시예 3 cDNA의 염기 서열 분석

생쥐 단일클론항체 KR127의 가변영역을 암호하는 DNA 염기 서열을 분석한 결과, 이 면역유전자들은 항체 구조에 특징적인 전기와 배열을 음역하게 갖추고 있으며, 구체적으로 중쇄는 면역글로불린 여러 그램 가문에서 생쥐 서브그룹 II (A)에 속하며, 경색는 생쥐 서브그룹 II에 속한다. 항원을 인식하는 CDR3 잔기들은 중쇄의 경우, CDR1은 31-35, CDR2는 50-66, CDR3는 95-104이며, 경색의 경우 CDR1은 24-39, CDR2는 55-61, CDR3는 94-102에 해당하였다. 구조상 필수적인 디설파이드 결합은 중쇄의 경우 22번과 96번 시스테인이, 경색의 경우 23번과 63번 시스테인이 관여하였다. 가변 영역의 말단 부분인 J (Joining) 미니유전자는 중쇄의 경우 103-115번에, 경색는 103-113번에 위치하였다. 이 유전자의 분석 결과로부터 본 발명의 플라스미드 벡터 pKR127K와 pKR127H에 클로닝되어 있는 경색 및 중쇄 유전자는 기능적임을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, HBV 의 표면항원 프라-S1 의 43-49번 아미노산 위치에 결합하는 새로운 단일 클론항체 KR127 의 가변 영역의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA 유전자는 기능적이므로 이를 인간 항체 유전자와 결합시켜 발현시키면 adr, adw, ayw 등 여러 타입의 HBV 중화에 부작용이 적은 인간화 항체를 개발할 수 있고, 이는 HBV 감염의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[서열 목록]

서열번호 : 1

서열의 길이 : 31

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 1

5'-GGAGTCGACT GAGGCACCTC CAGATGTTAA C-3'

[서열 목록]

서열번호 : 2

서열의 길이 : 31

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 2

5'-CGGTCGACAG GGATCCAGAG TTCCAGGTCA C-3'

[서열 목록]

서열번호 : 3

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 3

5'-AGATTCTAGA (A/T)TG(A/C)TGACCC AA(A/T)CTTCACT CTC-3'

[서열 목록]

서열번호 : 4

서열의 길이 : 33

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 4

5'-AGGTTCTAGA GT(G/T)CTCAC(C/T)C A(A/G)TCTCCAGC AAT-3'

[서열목록]

서열번호 : 5

서열의 길이 : 46

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 5

5'-ATATGTCGAC GAGGTGAAGC TGCAGGAGTC AGGACCTAGC CTGGTG-3'

[서열목록]

서열번호 : 6

서열의 길이 : 32

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 6

5'-ATATGTCGAC AGGT(C/G)(A/C)AACT GCAG(C/G)AGTC(A/T) GG-3'

[서열목록]

서열번호 : 7

서열의 길이 : 32

서열의 형 : 핵산

쇄의 수 : 1본쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 7

5-ATATGTCGAC AGGT(C/G)CAGCT GCAG(C/G)AGTC(A/T) GG-3'

[서열목록]

서열번호 : 8

서열의 길이 : 324

서열의 형 : 핵산

색의 수 : 1분쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 8

```

GATATCTTGA TGACCCAAC TCCACTTATT TTGTCGGTTA CCATTGGACA ACCAGCCTCT 60
ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA TATAGTAATG GAAAAACCTA TTGGAATTGG 120
TTATTACAGA GGCCAGGCCA GTCTCCAAAG CGCCTAATCT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC 180
TCTGGAGTCC CTGACAGGTT CACTGGCAGT GGATCAGGAA CAGATTTTAC ACTGAAAATC 240
ATCAGAGTGG AGGCTGAGGA TTGGGGAGTT TATTACTGCG TGCAAGGTAC ACATTTTCCT 300
CAGACGTTCC GTGGAGGCAC CAAGCTGGAA ATCAAAAGG 339

```

[서열목록]

서열번호 : 9

서열의 길이 : 345

서열의 형 : 핵산

색의 수 : 1분쇄

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 기타 핵산 (올리고 뉴클레오타이드)

서열 9

CAGGTGCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAA CTGGTGAAGC CTGGGGCCTC AGTGAAGATT 60
 TCCTGCAAAAG CTTCCTGGCTA CGCATTTCAGT AGTTCTTGGG TGAACCTGGGT GAAGCAGAGG 120
 CCTGGACAGC GTCTTGAGTG GATTGGACGG ATTTATCCTG GAGATGGAGA TACTAACTAC 180
 AATGGGAAGT TCAAGGGCAA GGGCACACTG ACTGCAGACA AATCCTCCAG CACAGCCTAC 240
 ATGCAGCTCA GCAGCCTGAC CTCTGTGGAC TCTGCGGTCT ATTCTGTGC AAGAGAGTAC 300
 GACGAGGCTT ACTGGGGCCA AGGGACTCTG GTCACGTGCT CTGCA 345

[서열 목록]

서열번호 : 10
 서열의 길이 : 113
 서열의 형 : 아미노산
 색의 수 : 1본색
 형태 : 직쇄상
 서열의 종류 : 단백질

서열 10

D I L M T Q T P L I L S V T I G 16
 Q P A S I S C K S S Q S L L Y S 32
 N G K T Y L N W L L Q R P G Q S 48
 P K R L I Y L V S K L D S G V P 64
 D R F T G S G S G T D F T L K I 80
 I R V E A E D L G V Y Y C V Q G 96
 T H F P Q T F G G G T K L E I K 112
 R 113

[서열 목록]

서열번호 : 11
 서열의 길이 : 115
 서열의 형 : 아미노산
 색의 수 : 1본색

형태 : 직쇄상

서열의 종류 : 단백질

서열 11

```

Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A 16
S V K I S C K A S G Y A F S S S 32
W M N W V K Q R P G Q G L E W I 48
G R I Y P G D G D T N Y N G K F 64
K G K A T L T A D K S S S T A Y 80
M Q L S S L T S V D S A V Y F C 96
A R E Y D E A Y W G Q G T L V T 112
V S A 115

```

(57) 청구의 범위

청구항 1

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 종쇄의 가변 영역을 암호하는 서열 9의 염기 서열을 포함하는 cDNA 유전자.

청구항 2

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 생쥐 단일클론항체의 경쇄의 가변 영역을 암호하는 서열 8의 염기 서열을 포함하는 cDNA 유전자.

청구항 3

제 1항의 cDNA 유전자가 포함하는 플라스미드 벡터 pKR127H.

청구항 4

제 3항의 플라스미드 벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체 DH5 α /pKR127H (수탁번호 : KCTC 0333 BP).

청구항 5

제 2항의 cDNA 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터 pKR127K.

청구항 6

제 5항의 플라스미드 벡터로 형질전환된 대장균 형질전환체 DH5 α /pKR127K (수탁번호 : KCTC 0334 BP).

청구항 7

B형 간염 바이러스의 표면항원 프리-S1의 43-49번 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합하는 서열 10의 경쇄 및 서열 11의 종쇄로 이루어진 생쥐 단일클론항체의 가변 영역.

청구항 8

제 1항 및 제 2항의 생쥐 단일클론항체의 가변 영역 유전자를 인간 항체 유전자와 융합시켜 HBV 표면 항원 프리-S1를 인식하는 인간화 항체를 생산하는데 사용하는 용도

도면

521

1 GAT ATC TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTT ATT TTG TCG GTT ACC 42
 1 D I L M T Q T P L I L S V T 14
 43 ATT GGA CAA CCA GCC TCT ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC 84
 15 I G Q P A S I S C K S S Q S 28
 85 CTC TTA TAT AGT AAT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG TTA TTA 126
 29 L L Y S N G K T Y L N W L L 42
 127 CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG 168
 43 Q R P G Q S P K R L I Y L V 56
 169 TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT 210
 57 S K L D S G V P D R F T G S 70
 211 GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC ATC AGA GTG GAG 252
 71 G S G T D F T L K I I R V E 84
 253 GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT 294
 85 A E D L G V Y Y C V Q G T H 98
 295 TTT CCT CAG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA 336
 99 F P Q T F G G G T K L E I K 112
 337 CGG 339
 113 R 113

도면2

1	CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAA CTG GTG AAG CCT	42
1	Q V Q L Q Q S G P E L V K P	14
43	GGG GCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA	84
15	G A S V K I S C K A S G Y A	28
85	TTC AGT AGT TCT TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA	126
29	F S S S W M N W V K Q R P G	42
127	CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA	168
43	Q G L E W I G R I Y P G D G	56
169	GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG	210
57	D T N Y N G K F K G K A T L	70
211	ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC	252
71	T A D K S S S T A Y M Q L S	84
253	AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA	294
85	S L T S V D S A V Y F C A R	98
295	GAG TAC GAC GAG GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT	336
99	E Y D E A Y, W G Q G T L V T	112
296	GTC TCT GCA	345
113	V S A	115